3.2.1.4 Cortes semifinos.

3.2.1.4.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

Estas muestras de tejido fueron incluidas en resinas epóxicas, lo cual permite realizar cortes muy delgados (350 nm) facilitando así evaluar de una manera más fina los detalles morfológicos de los tejidos. En los cortes del cuerpo estriado del grupo control observamos tractos de apariencia normal, con una vaina de mielina íntegra (figura **18 A**). En contraste con lo observado en los corte del cuerpo estriado del grupo expuesto, en este grupo los tractos de fibras nerviosas mostraron la apariencia de una masa amorfa, debido a que la vaina de mielina de estas fibras se encuentra fragmentada (figura **18 B**). Estos resultados fueron consistentes en toda el área ocupada por el estriado, ya que se muestrearon los cortes en la totalidad de esta región.

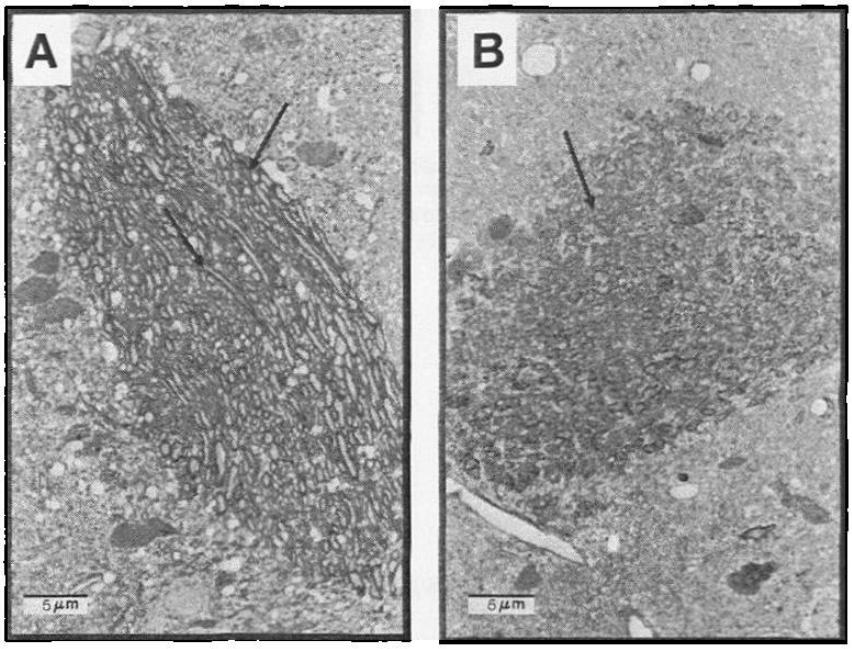


Figura 18. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestra un tracto de fibras nerviosas con sus axones cubiertos por su vaina de mielina íntegra (flecha) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio Se observa el tracto nervioso con apariencia de una masa amorfa debido a que as capas de mielina que recubren los axones se encuentra fragmentada. Inclusión en resinas epoxicas, azul de toluidina 390x

3.2.1.4.2 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (grupo de seis meses).

En el grupo al que se le suspendió por dos meses el tratamiento con arsénico (seis meses) observamos que las vainas de mielina de las fibras nerviosas mostraron una continuidad (figura 19 B). semejante a las que observamos en los cortes del cuerpo estriado de los animales control (figura 19 A).

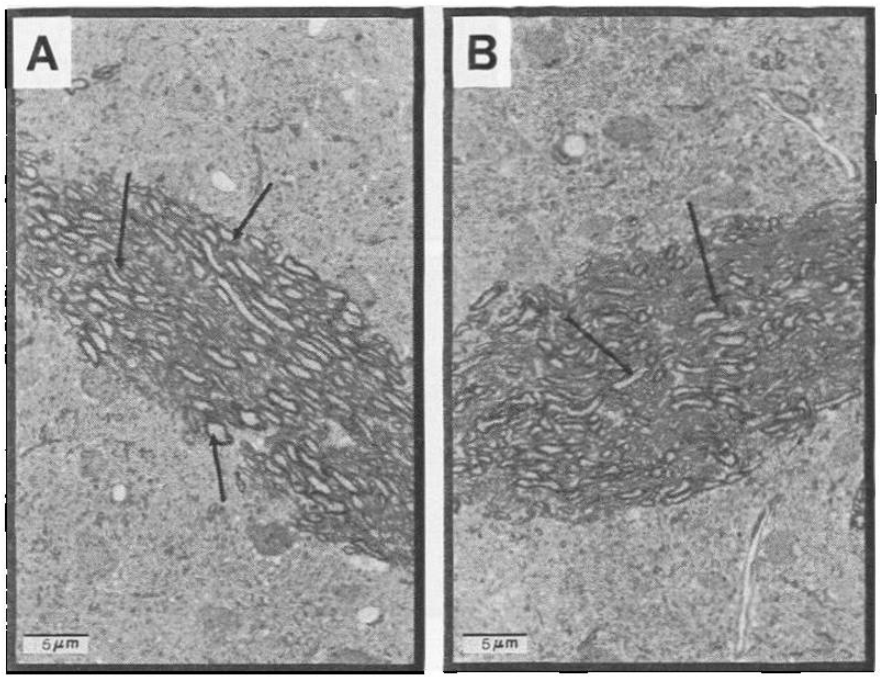


Figura 19. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento Se muestra fibras nerviosas con morfología normal (flecha) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsenico Obsérvese que la vaina de mielina de las fibras se asemeja al control (flecha) Inclusión en resinas epoxicas azul de toluidina 390x.

3.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.

3.2.2.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

La técnica de TUNEL indica si existe fragmentación de la cromatina, un parámetro para evaluar la apoptosis. En la aplicación de esta técnica corrimos un control positivo en el cual inducimos la fragmentación de la cromatina indicándonos la positividad con la presencia de los núcleos intensamente teñidos (figura 20 A), además realizamos un control negativo en el cual omitimos la enzima de marcaje por ello los núcleos aparecen sin teñir (figura 20 B). Los resultados obtenidos al llevar a cabo el análisis de los cortes de estriado del grupo de animales control y del grupo expuesto, respectivamente, la coloración de los núcleos se asemejó al control negativo (figura 20 B), lo cual indica la ausencia del proceso apoptótico en el cuerpo estriado en el momento que se sacrificaron los animales (figura 20 C y D). Debido a estos resultados, ya no se efectuó la prueba de TUNEL en los restantes grupos experimentales (grupo de seis meses).

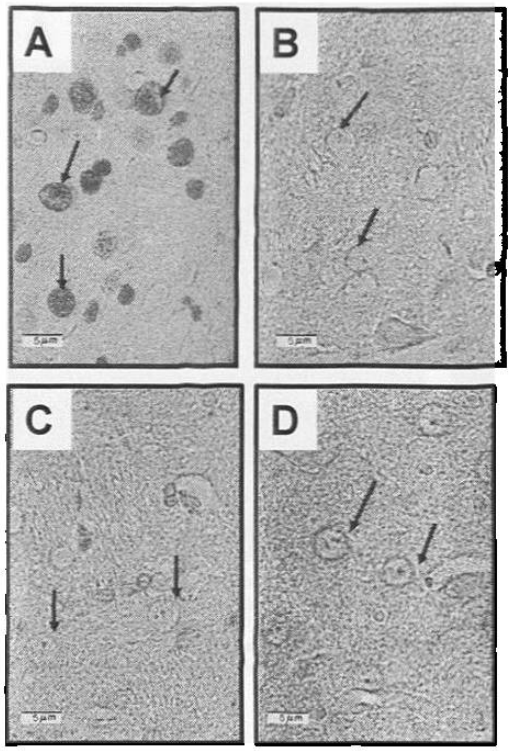


Figura 20. Fotomicrografías de cuerpo estriado de cerebro de rata **A.** Control positivo Núcleos con cromatina fragmentada indicando la positividad de la técnica (Fecha) **B.** Control negativo **C.** Control sin tratamiento. **D.** Grupo expuesto con arsenito de sodio por cuatro meses Obsérvese que los núcleos de los cortes de los dos grupos experimentales se asemejan a control negativo (Fecha) Técnica de TUNEL 390x

3.3.3 Microscopía electrónica.

3.3.3.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

Al llevar a cabo el análisis ultraestructural confirmamos lo que ya habíamos observado al microscopio de luz, ya que la vaina de mielina en los tractos de los cortes del cuerpo estriado de los animales control se mostró íntegra, con sus contornos bien delimitados (figura 21 A), en contraste con lo que se observó en los animales expuestos en donde los axones presentaron su vaina de mielina discontinua dando. (figura 21 B). Estos hallazgos ultraestructurales confirman la desmielinización asociada a la exposición a arsénico.

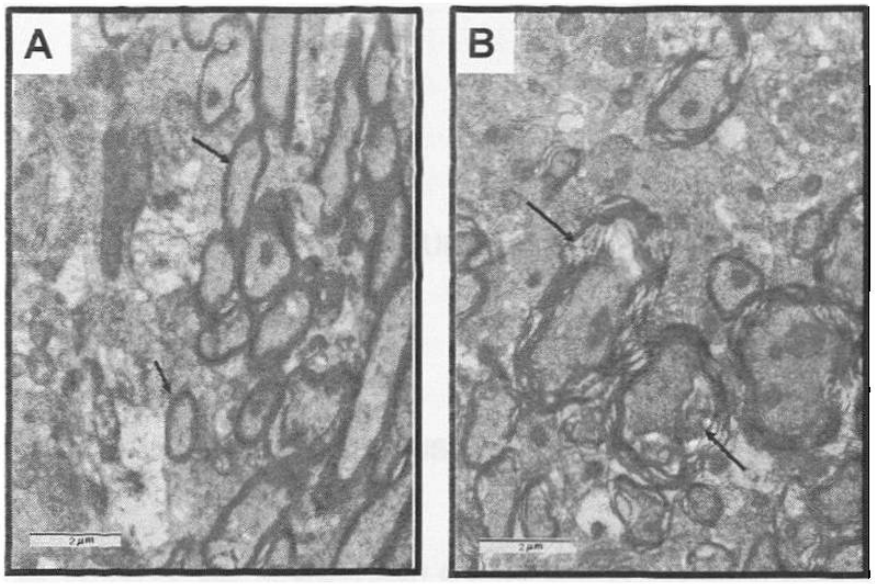


Figura 21. Micrografía electrónica de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Contro de an males sin tratam ento Se muestran os axones con su va na de m e na integra f echa) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sod o Se observa un grupo de axones en orte transversal mostrando nterrupción en su va na de m e ina flecha arga) ndicando desm elinizacion Inclus ón en res nas epoxicas contrastados con acetato de plomo citrato de uranilo 19000x

3.3.3.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (grupo de seis meses).

La morfología ultraestructural de las vainas de mielina de los axones del cuerpo estriado, de este grupo experimental (figura 22 B) presentaron una vaina de mielina semejante al grupo control, de animales sin tratamiento (figura 22 A) con sus contornos bien delimitados . Estos hallazgos sugieren que la desmilinización fue reversible al suspender por dos meses la exposición al arsénico.

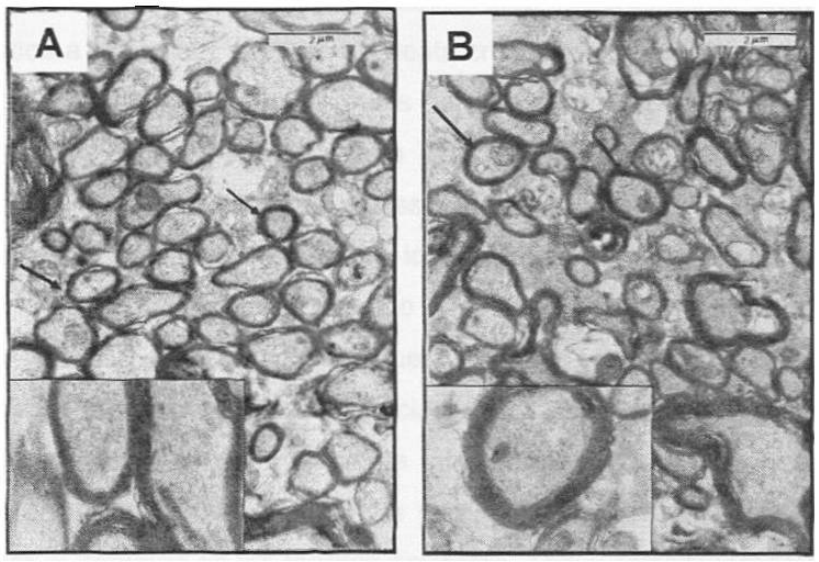


Figura 22. Micrografía electrónica de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Contro de an ma es s n tratam ento Se muestra grupo de axones con morfolog a norma flecha **B** Grupo expues'o por cuatro meses con arsen to de sodio y dos meses s n estar expuestos a arsen co bservese que as va nas de m e na se asemejan a os contro es flecha nc us on en es nas epox cas contrastados con acetato de uran o y c trato de p omo 19 000x

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la exposición crónica al arsénico en el agua de bebida (36 mg/l) causa alteraciones morfológicas a las neuronas y fibras nerviosas del cuerpo estriado de cerebro de rata, durante la gestación y etapas postnatales, y además que al suspender por dos meses la intoxicación se recupera notablemente el daño causado a las fibras nerviosas, mientras las alteraciones de los cuerpos neuronales persisten durante el tiempo de observación. De acuerdo a estos resultados, se acepta la hipótesis del trabajo "Dosis bajas de arsenito de sodio durante el desarrollo embrionario y posnatal de la rata producen alteraciones celulares en el cuerpo estriado". Estos hallazgos se discutirán desde la perspectiva de su relevancia para el estudio de la neurotoxicidad del arsénico, así como desde el punto de vista de la inserción de esta información dentro de las hipótesis actuales sobre los mecanismos de toxicidad del arsénico.

Pertinencia de los modelos animales en el estudio de la neurotoxicidad del arsénico

Los efectos neurotóxicos del arsénico han despertado recientemente gran interés a raíz de estudios enfocados a población humana expuesta crónicamente a este metaloide, por lo que se han comenzado a construir modelos animales para su estudio. Dado que a través de estudios en población expuesta, se ha encontrado que el arsénico afecta funciones cerebrales superiores, especialmente en niños y adolescentes, la pregunta que surge es que sí los resultados, obtenidos en animales como los roedores pueden proporcionar información relevante sobre lo que podría estar ocurriendo en los humanos. Con el fin de responder a ello, es conveniente volver a mencionar aquí que los niños expuestos presentaron alteraciones auditivas (Bencko y Simon., 1977), deficiencias en la comprensión verbal, memoria a largo plazo y lenguaje, disminución del coeficiente intelectual y deficiencia en pruebas de función cognitiva (Calderón y col., 2001; Wasserman y col., 2004). En China, uno de los países más contaminados por el arsénico en los mantos acuíferos, Tsai y colaboradores en el 2003 llevaron a cabo un estudio en adolescentes que estuvieron expuestos a altas concentraciones de arsénico (131- 185 ppb) a través del agua de bebida, y mediante una aplicación de cuatro

pruebas para evaluar el comportamiento demostraron deficiencias en la memorización de patrones y símbolos y en la atención. Estas alteraciones en humanos expuestos sugieren que daños neuronales en regiones cerebrales que participan en los procesos de integración de la memoria y el aprendizaje. Con el fin de aproximar este tipo de problemas mediante un modelo animal, se puede sólo recurrir a pruebas de conducta, por lo que construimos un modelo *in vivo* en el cual se reprodujeran los efectos neurotóxicos y las principales características que produce la exposición crónica al arsénico, específicamente la alteración del comportamiento y deficiencias en las tareas de aprendizaje, sin que presentaran signos de toxicicidad, como sería diarrea, disminución de la ingesta, caída de pelo y cambios en el peso corporal.

Los resultados obtenidos en la prueba del laberinto acuático, en el grupo de los animales que estuvieron expuestos por cuatro meses al arsénico reflejan un déficit significativo en la habilidad para realizar esta prueba de memoria espacial. A pesar de que esta prueba de conducta se utiliza para evaluar la integridad del circuito hipocampal, y no el cuerpo estriado, existen evidencias que la vía nigroestriatal participa en el proceso de memoria aprendizaje y que este proceso es una vía independiente a la memoria hipocampal (Da Cunha y col., 2003). Y aún estudios recientes realizados en ratas dañadas evaluadas con esta prueba de conducta demuestran que el hipocampo dorsal es el implicado en esta tarea espacial y no el hipocampo ventral (Pothuizen y col., 2004). Teniendo en consideración que la prueba de conducta del laberinto en T es la más recomendada para evaluar la integridad del cuerpo estriado (El Massioui y col. 2001) aplicamos esta prueba en forma piloto en el presente trabajo. Sin embargo, los resultados que obtuvimos no fueron satisfactorios debido al poco tiempo de entrenamiento, el cual no era posible alargarlo ya que, para llevar a cabo esta prueba es necesario privar a los animales de agua, y ese era precisamente el medio de exposición al arsénico, por lo que para el estudio formal continuamos solamente con las pruebas del laberinto acuático, que no requieren privación de agua. Los resultados obtenidos con la prueba del laberinto acuático fueron muy satisfactorios ya que en relación con los parámetros morfológicos empleados en este trabajo, los valores obtenidos en el grupo de animales expuestos por cuatro meses al arsénico y dos meses con suspensión de tóxico (grupo de seis meses), reflejan una recuperación muy significativa en esta prueba de memoria espacial con respecto al grupo de intoxicación por cuatro meses. Consideramos que esta mejoría podría deberse a la remielinización de las fibras nerviosas que se observó en el grupo de seis meses.

Para conseguir este modelo animal apropiado desde el punto de vista conductual, es importante considerar que se emplearon dosis de arsénico mucho más altas que a las que se expone un humano. La concentración total de arsénico en cerebro encontrada en este trabajo es de 178±100 ng/g, la cual es considerablemente más elevada que los niveles más altos

encontrados en sangre de humanos expuestos por largo tiempo al arsénico, los cuales variaban de 4.32 - 46.54 μg/l, según el estudio reportado por Wu y colaboradores en el año 2003.

Por otra parte, la concentración de arsénico, obtenida en el grupo de animales expuestos hasta los cuatro meses de edad (178±98 ng/g), no mostró diferencia significativa con respecto a la cantidad obtenida en el grupo de animales a los que se les suspendió por dos meses la intoxicación. Este hallazgo sugiere que el arsénico no se eliminó en ese período de tiempo, tal vez porque la velocidad de remoción del arsénico en el cerebro se lleva a cabo lentamente; no como en otros órganos, en los que la velocidad de eliminación es más rápida como en pulmón que se elimina entre los 9 y 17 días, o en la piel en la cual se elimina más lentamente debido a que la queratina posee grupos sulfhidrilos y el arsénico es reactivo con estos grupos (Schoolmeester y White, 1980). Datos recientes proporcionados por Simeonova y colaboradores en el 2000 indican acumulación de arsénico inorgánico trivalente y pequeñas cantidades de su metabolito dimetilado (DMA V) en ratones expuestos por 4 semanas al arsenito en el agua de beber (100 ppm). Por lo que no se puede descartar que en nuestro modelo experimental el arsénico se remueva más lentamente. A pesar de que se encuentra bien documentado que después de la exposición aguda de arsénico en animales del laboratorio, el arsénico inorgánico se absorbe rápidamente y se distribuye a través del cuerpo en forma de sus metabolitos y es excretado principalmente en la orina (Odanaka y col., 1980; Vahter y Norin, 1980; Vahter; 1981; Hughes y col., 1994, 1999), la disposición del arsénico en el cerebro después de dosis repetidas no se encuentra documentada.

Por lo anterior, podemos concluir que si bien sería deseable conseguir un modelo animal donde hubiese manifestaciones conductuales a dosis más bajas, semejantes a las que se expone el humano, el presente modelo permitió analizar alteraciones morfológicas del sistema nervioso central en 3 condiciones que permiten hacer aportaciones relevantes: 1) modelo *in vivo* de exposición crónica, comparable con otros estudios reportados en la literatura y en el que se alcanzan niveles de arsénico en tejido alrededor de 8 veces más altos que los reportados en sangre en individuos expuestos, 2) alteraciones conductuales en ausencia de pérdida de peso y síntomas de intoxicación y, 3) reversibilidad de las alteraciones conductuales al cesar la exposición.

Desmielinización e hipótesis actuales sobre mecanismos de acción del arsénico.

La desmielinización del sistema nervioso central no se había reportado como un efecto de la exposición crónica a arsénico, mientras que la desmielinización en el sistema nervioso periférico se encuentra reportada desde hace décadas, ya que se conoce que la exposición a altas dosis

de arsénico causa una polineuropatía simétrica con degeneración Walleriana aguda de fibras mielinizadas (Heymann y col., 1956; Goebel y col., 1990). Por otro lado, también existen estudios en intoxicación con metales pesados (plomo), en los que se reporta una desorganización morfológica en la vaina de la mielina, la cual se atribuye a una alteración en la actividad de la CNPasa que participa en la síntesis de la mielina (Dabrowska-Bouta y col., 2004; Deng y Poretz, 2001). Basados en las principales hipótesis acerca del mecanismo de toxicidad del arsénico, consideramos que la desmielinizacion de las fibras nerviosas del SNC en animales expuestos crónicamente al arsénico, puede deberse ya sea a la generación de radicales tóxicos de oxígeno (ROS) y/o la hipometilación.

La mayoría de las especies reactivas de oxígeno se producen por una reducción parcial del oxígeno en el transporte de electrones en la mitocondria y es así como se produce el radical **superóxido** el cual es reducido a **peróxido de hidrógeno** por la superóxido dismutasa; este radical libre (peróxido de hidrógeno) a su vez es reducido a radicales **hidroxilo** mediante la intervención del fierro por la reacción de Fenton. Estas tres especies reactivas por sí mismas pueden inducir un daño, o también pueden activar vías de señalamiento intracelular alterando la función celular (Garcia- Chávez y col., 2003), por lo que podrían estar interviniendo en el daño a membranas y consecuentemente en la desmielinización.

Por otra parte la **hipometilación** puede ser un evento ocasionado por la entrada del arsénico a las células nerviosas, ya que, el arsénico al entrar al cerebro lo hace a través de transportadores del glicerol, los cuales son canales de membrana multifuncionales (Lui y col., 2002), o bien por transportadores GLUT1 que se localizan en la membrana de los eritrocitos y células endoteliales de la barrera hematoencéfalica (Vannucci y col., 1997), y una vez que éste ingresa al cerebro se metaboliza a sus especies mono- metiladas y dimetiladas, ya que el cerebro posee esta capacidad, como lo demostraron Rodríguez y colaboradores en el 2004.

Como ya se conoce, S-adenosilmetionina (SAM) es un donador de grupos metilos que son necesarios para numerosas reacciones de **transmetilación**, entre las que se encuentra la biometilación del arsénico, la metilación de la fosfatidiletanolamina y la de la proteína básica de la mielina (PBM) (Lee y col., 1992; Small y col., 1981), dos componentes muy importantes de la mielina. Por ello consideramos que la alta demanda de grupos metilos para la biometilación de arsénico, disminuye la disponibilidad de estos grupos y por consecuencia inhibe la metilación del residuo 107 de arginina de la PBM (Small y col., 1981). Esta carencia de metilación puede conducir a una alteración de la mielina ya que la arginina metilada es esencial para mantener la compactación de las capas de mielina, y esto lo hace mediante reacciones de cadena cruzada, debido a que esta molécula es más hidrofóbica que la arginina por sí misma (Brostoff y Eylar, 1971). La hipometilación se ha reportado como un posible mecanismo de toxicidad del arsénico implicado en la carcinogenicidad (Chen y col 2004), y un segundo hallazgo en este trabajo que apunta a que esta alteración pueda estar implicada también en la desmielinización fue la recuperación de la vaina de mielina después de suspender por dos meses la exposición al

arsénico. Este resultado sugiere que, al ya no haber más entrada de arsénico al cerebro, ya no son necesarios metilos para su eliminación, y por lo tanto esos grupos químicos quedan disponibles para metilar la proteína básica de la mielina, y por consecuencia se recupere en la vaina mielina. Sin embargo, la persistencia de las alteraciones en los cuerpos neuronales sugiere que tal vez sea necesario más tiempo para su recuperación o que tal vez el daño ocasionado sea de manera irreversible.

Con respecto a la apoptosis, tanto la c- Jun N protein cinasa terminal (JNK) como la p38 son moléculas moduladores de la apoptosis en varios tejidos, además de otras funciones celulares. Namgung y Xia (2000) reportaron estudios *in vitro* en neuronas corticales de rata expuestas al arsenito de sodio y demostraron que JNK y p38 contribuyen a la apoptosis inducida por el arsenito de sodio en neuronas corticales. El arsénico también es inductor de apoptosis en células mononucleares humanas (De la fuente y col., 2002). Además, Chattopadhyay y colaboradores (2002 a y b) realizaron estudios *in vivo e in vitro* con dos modelos experimentales, el primero en el que ratas fueron expuestas durante toda la gestación a arsenito de sodio en el agua de beber (0.03, .30 y 3.0 ppm) y a los neonatos se les extrajo el cerebro y estos explantes cerebrales fueron mantenidos en cultivo. El segundo modelo consistió en explantes cerebrales fetales humanos, también expuestos al arsénico. Ellos reportan que la exposición al arsénico causó cambios en la membrana de las neuronas, indicado por la generación y liberación de especies reactivas de oxigeno (ROS) y de nitrógeno. Estos autores proponen la presencia de apoptosis basados en criterios morfológicos, sin embargo, en las fotomicrografías que muestran no está clara la fragmentación de la cromatina ni la presencia de los cuerpos apoptóticos. Otro hecho de llamar la atención en el estudio antes referido es el comentario que los autores hacen acerca de que una dosis de 3 ppm de arsénico es una dosis cercana a letal, ya que en su estudio un gran número de madres abortaron y los productos murieron. Sin embargo, la dosis empleada en nuestro modelo y otros modelos es mayor (36 ppm) y con esta dosis no se presentaron abortos ni mortalidad. En contraste con estos antecedentes, el resultado negativo obtenido en el TUNEL en nuestro modelo muestra que las células no presentaban apoptosis al momento del sacrificio, que fue a la edad adulta, a diferencia de los estudios previos, donde el fenómeno se estudió durante el desarrollo o a través de una exposición *in vitro.*

CAPÍTULO CINCO

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES.

5.1 CONCLUSIONES.

1. Se acepta la hipótesis planteada **"Dosis bajas de arsenito de sodio durante el desarrollo embrionario y posnatal de la rata producen alteraciones celulares en el cuerpo estriado"**, ya que se demuestran por primera vez, alteraciones morfológicas en los cuerpos neuronales y desmielinización de las fibras nerviosas en esta región del cerebro.

2. Además se demuestra que la desmielinización **es reversible** al suspender por un período de dos meses la exposición al arsénico, sin embargo las alteraciones neuronales persistieron, durante el tiempo de observación.

5.2 PERSPECTIVAS.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran interés continuar investigando los posibles mecanismos mediante los cuales la exposición crónica a arsénico causa desmielinización, así como qué tipos de neuronas están afectadas y en qué consisten las alteraciones observadas. Respecto a la desmelinización nosotros sugerimos que la vía mediante la cual se lleva a cabo este proceso es por hipometilación de la proteína básica de la mielina (PBM) (componente abundante en la vaina de mielina); debido a ello sería de interés: 1) **cuantificar** las concentraciones de especies metiladas del arsénico, así como 2) **cuantificar** las concentraciones de la proteína básica de la mielina, y 3) **cuantificar** las concentraciones de la s- adenosil metionina ya que esta molécula es la donadora de los grupos metilos, y los resultados constituirían un elemento clave para probar nuestra hipótesis. Por otro lado no se puede descartar que los oligodendrocitos, células de la glia encargadas de llevar a cabo la síntesis de mielina de las fibras nerviosas del sistema nervioso central se encuentren disfuncionales, o disminuidas en número, y ese sea el motivo por lo cual la vaina de mielina se muestre alterada, por ello, para descartar esta hipótesis valdría la pena realizar un **marcaje** mediante técnicas inmunohistoquímicas a este tipo celular con anticuerpos GalC, y más allá de la observación cualitativa realizar un análisis cuantitativo mediante morfometría.

Otro hallazgo en este trabajo es la presencia de alteraciones neuronales observadas por microscopía de luz, por ello una continuación de este, sería **caracterizar** el tipo de neuronas alteradas mediante técnicas inmunohistoqímicas, la técnica de Golgi y el estudio ultraestructural.

La exposición al arsénico induce apoptosis según reportes previos, sin embargo en este trabajo no se encontró este tipo de muerte celular, sin embargo no se puede descartar que en otro momento, durante la exposición a arsénico la apoptosis se presente. Por ello, sería de interés **realizar** la misma la técnica del TUNEL que se aplicó en este trabajo a otros tiempos y así descartar esta hipótesis.

Por último, existen varias regiones del cerebro implicadas en el proceso de memoria-aprendizaje. Al presentarse un déficit en la prueba de memoria espacial en los animales expuestos al arsénico, cabe la posibilidad que no sólo se encuentre alterado el estriado sino también otras áreas de cerebro implicadas en estos procesos, como lo son el hipocampo y la corteza. Por tanto, **analizar** mediante parámetros bioquímicos y morfológicos estas áreas proporcionaría información importante.

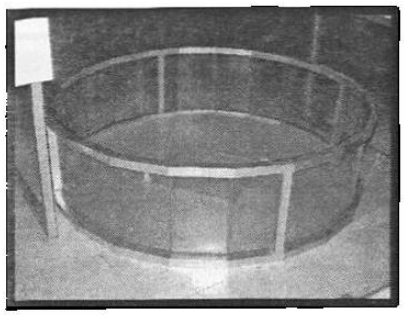
5.3 CONTRIBUCIONES.

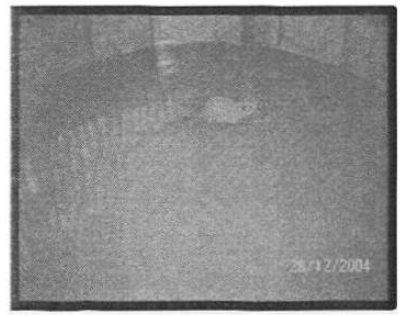
Con este estudio se contribuye a esclarecer el mecanismo de neurotoxicidad del arsénico, especialmente en el área morfológica ya que, mediante las técnicas aplicadas se demuestra que existe una coincidencia entre las alteraciones de comportamiento ya demostradas, y las alteraciones tanto de las neuronas como de las fibras nerviosas, sin embargo sería de gran interés, que se demostrara una relación causa-efecto entre los parámetros ya mencionados.

APÉNDICE A

TABLA 1

PRUEBA DE CONDUCTA DEL LABERINTO ACÚATICO





1. El animal se coloca en el interior de la alberca acrílica con la cabeza dirigida a cualquier sitio de la pared de la alberca y sobre la superficie del agua.

2. La prueba inicia tomando el tiempo que el animal tarda en encontrar la plataforma, se le dan cinco minutos para que la encuentre.

3. Si a los cinco minutos el animal no encuentra la plataforma, posteriormente, se coloca al animal manualmente encima de la plataforma (fracaso). Se le proporciona un minuto de descanso sobre la plataforma antes de iniciar el siguiente intento. El mismo tiempo se les da de descanso si encontraron la plataforma, por si mismos.

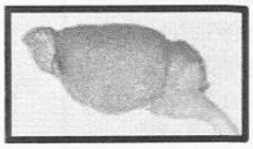
Esta prueba se realiza por 7 días con cuatro oportunidades diarias.

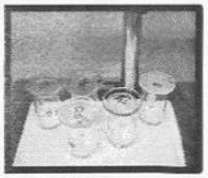
C.A. Stewart and R.G. Morris.

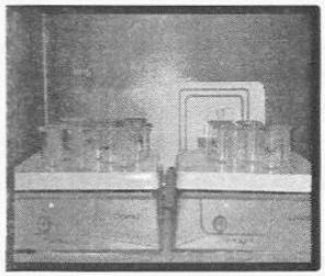
TABLA 2

TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA POR GENERADOR DE HIDRUROS.

Para cuantificar la concentración de arsénico.

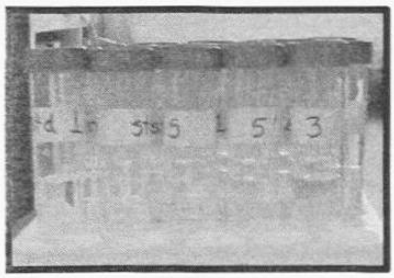




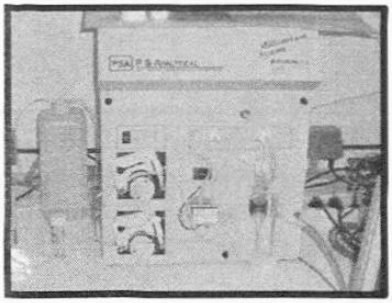


1.El tejido se fragmenta y coloca en un vaso de precipitado que contenga 6 ml de HNO_3 concentrado y 1 ml de ácido perclórico, se tapa con un vidrio reloj y ahí se deja durante toda la noche.

2. Digestión oxidativa. Al día siguiente se colocan los vasos en una parrilla de calentamiento a 80º C hasta desecar. En esta fase la materia orgánica se transforma hasta bióxido de carbono y agua, y la inorgánica prevalece en este caso el arsénico (como As^5 o As^3).



Se le añadien 7.5 ml de HCl concentrado.



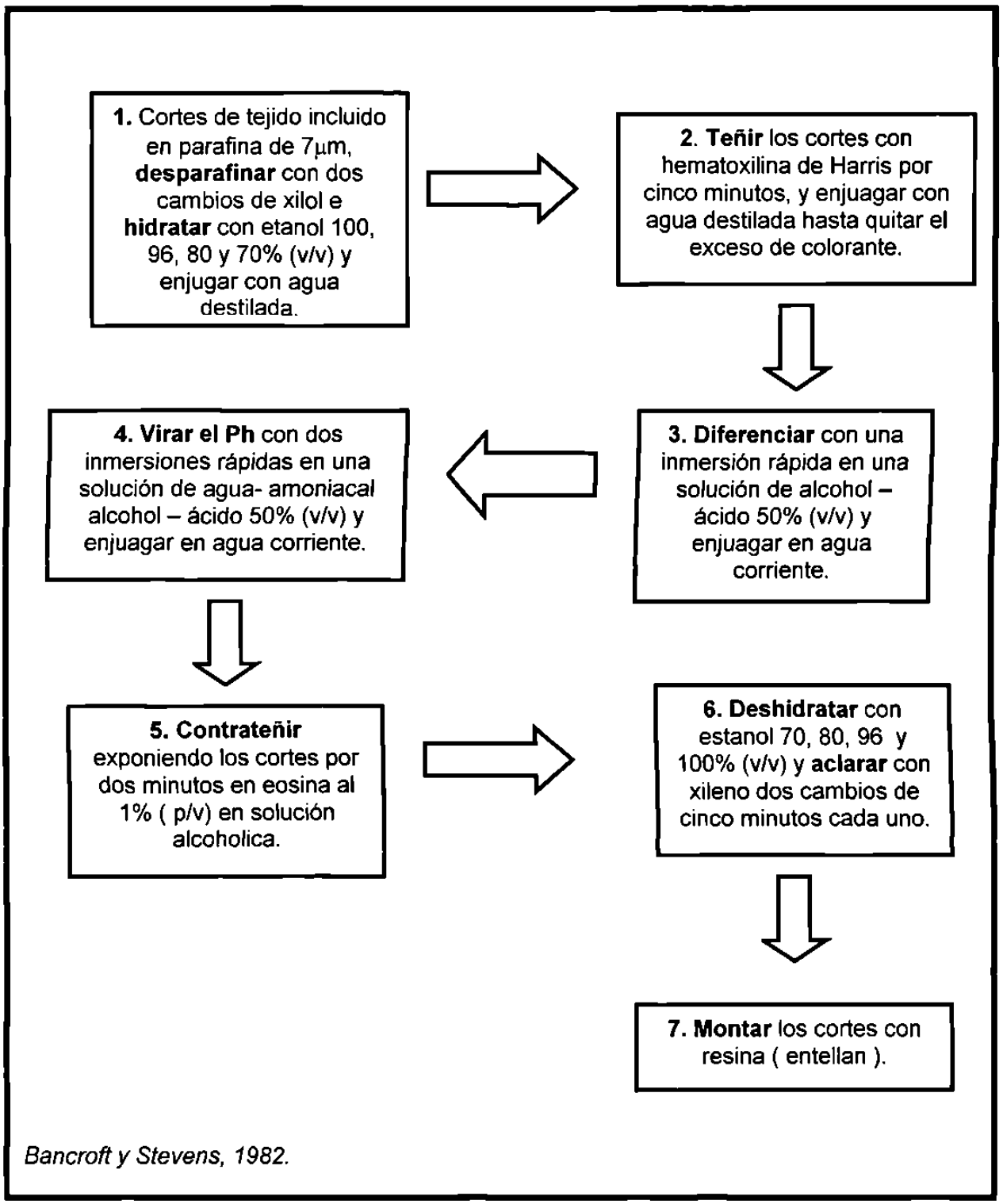
3. Reducción del arsénico pentavalente a trivalente. Se resuspende el precipitado con 17 ml de HCl al 3%, y se vacía la muestra a un tubo cónico de polipropileno, posteriormente se añaden 500µl de KI – ácido ascórbico (agente reductor).

4. Posteriormente se llevan las muestras a leer a un espectrofótometro de fluorescencia atómica. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de arsénico.

Rahman y col, 2000

TABLA 3

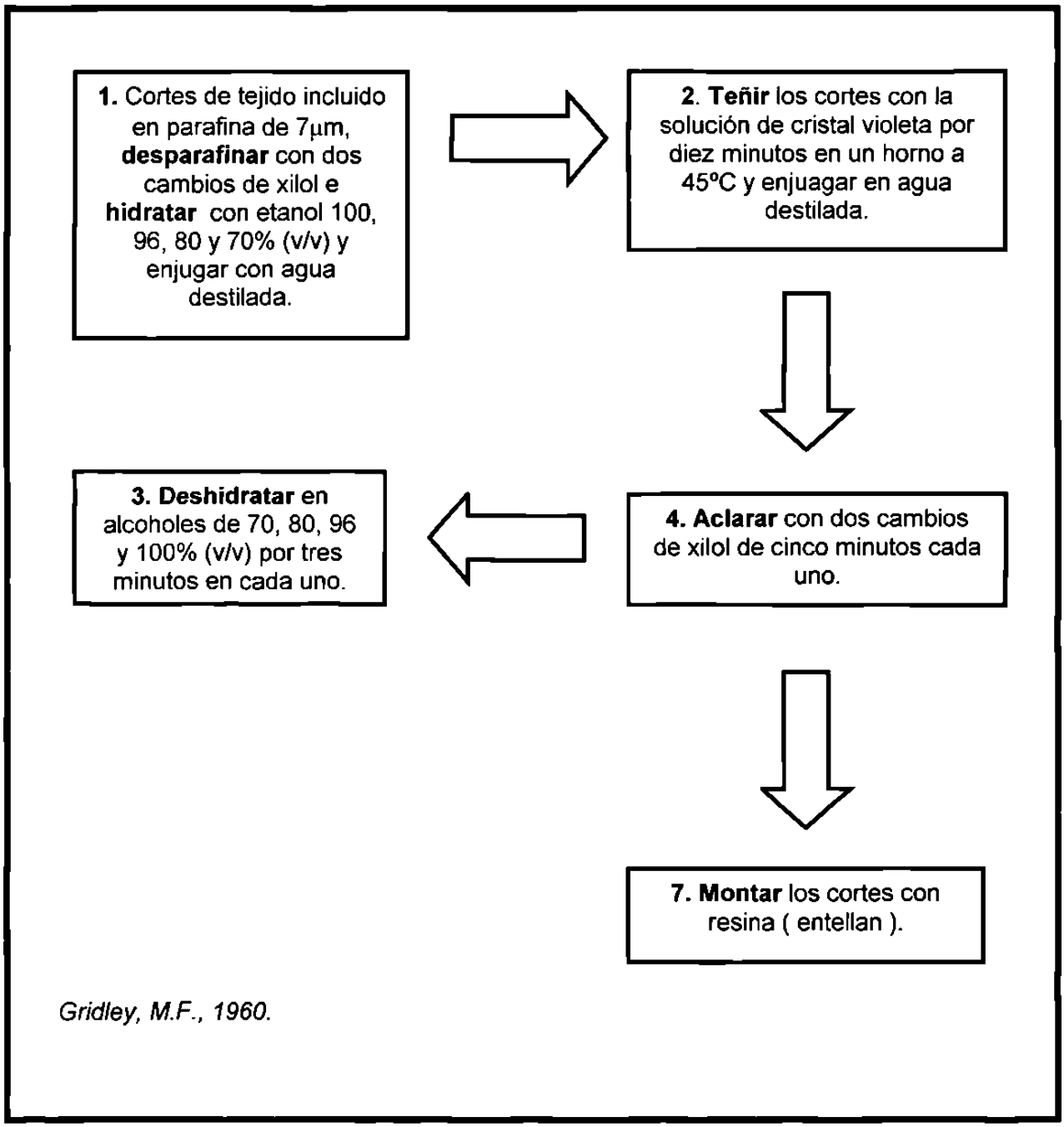
TÉCNICA DE HEMATOXILINA – EOSINA



Bancroft y Stevens, 1982.

TABLA 4

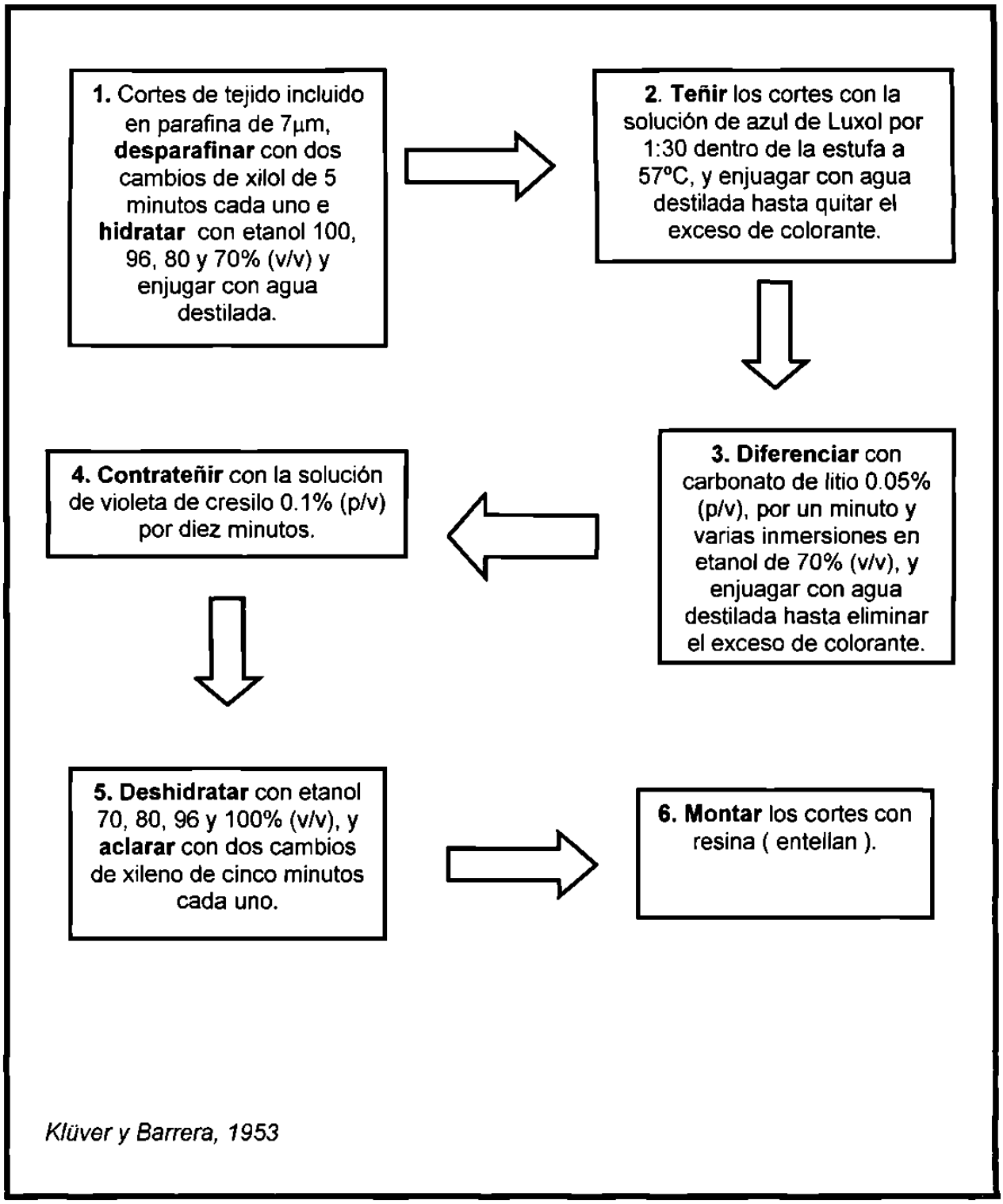
TÉCNICA DE NISSL.



Gridley, M.F., 1960.

TABLA 5

TÉCNICA DE KLÜVER - BARRERA



Klüver y Barrera, 1953

TABLA 6

TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN RESINAS EPÓXICAS

1. **Fijar** las muestras en solución de Karnovsky-Ito a temperatura ambiente por 30 minutos. →

2. **Lavar** en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4 tres veces, por 5 minutos cada uno. →

3. **Posfijar** en tetraóxido de osmio al 2% (p/v) a temperatura ambiente por 30 minutos.

4. **Lavar** en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4 tres veces, por 5 minutos. →

5. **Contrastar** las muestras con nitrato de uranilo al 2% (p/v) durante 30 minutos. →

6. **Lavar** en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4 tres veces, por 5 minutos.

7. **Deshidratar** las muestras durante 5 minutos con acetona al 30%, 50%, 70% y 90% (v/v), y tres veces con acetona al 100%, por 5 minutos. →

8. **Colocar** durante toda la noche en una mezcla de 1:1 de epon (resina epóxica-acetona). →

10. **Pre incluir** a temperatura ambiente durante 60 minutos, colocando las muestras en moldes para inclusión con epon al 100%.

→

11.- **Incluir** y polimerizar a 60°C durante 24 horas.

Richardson y col., 1960

APÉNDICE B

SOLUCIONES

B.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS ANÁLITICAS.

B.1.1 ÁCIDO CLORHÍDRICO AL 3%.

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml.
Agua desionizada	100 ml.

B.1.2 SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ARSÉNICO DE 1 ppm.

Solución estándar de arsénico de 1000 ppm 25 µl.

Colocarla en un matraz volumétrico de 25 ml y aforarlo con agua desionizada.

A partir de esta solución se prepararon los estándares siguientes:

	Estándar de arsénico de 1 ppm
Estándar 1	25µl.
Estándar 5	125µl.
Estándar 15	375µl.
Estándar 30	750µl.

B.1.3 SOLUCIÓN DE YODURO DE POTASIO 50% m/v EN ÁCIDO ASCÓRBICO AL 10%.

Yoduro de potasio	50 g.
Ácido ascórbico	10 g.
Agua desionizada	100 ml.

B.1.4 SOLUCIÓN DE BOROHIDRURO DE SODIO 0.7% m/v en hidróxido de sodio 0.1M.

Borohidruro de sodio	7 g.
Hidróxido de sodio	4 g.
Agua desionizada	1000 ml.

B.1.5 BLANCO REACTIVO.

Ácido clorhídrico concentrado	300 ml.
Solución de yoduro de potasio 50% m/v en ácido Ascórbico al 10%.	20 ml.

Y aforar con agua desionizada hasta un volumen de 1000 ml.

B.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS MORFÓLOGICAS.

B.2.1 SOLUCIONES PARA MICROSCOPÍA DE LUZ.

B.2.1 .1 BUFFER DE FOSFATOS SALINO 0.1 M.

Solución madre.

Solución A.

Fosfato monobásico de sodio	27.58 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución B

Fosfato dibásico de sodio	28.39 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución de trabajo.

Solución A	95 ml.
Solución B	409.5 ml.
Cloruro de sodio	9 g.

Diluir en agua destilada y aforar a 1000 ml. Ajustar pH 7.4.

B.2.1. 2 BUFFER DE FOSFATOS 0.2 M.

Solución madre.

Solución A.

Fosfato monobásico de sodio	27.58 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución B.

Fosfato dibásico de sodio	28.39 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución de trabajo.

Solución A	19 ml.
Solución B	81.9 ml.

Ajustar el pH 7.4.

B.2.1. 3 SOLUCIÓN DE PARAFORMALDEHÍDO – GLUTARALDEHÍDO AL 2% EN BUFFER DE FOSFATOS.

Solución madre.

Paraformaldehído	16 g.
Agua destilada	400 ml.

Mezclar y calentar hasta cerca de la ebullición, retirar de la parrilla y en agitación constante agregar gota a gota hidróxido de sodio hasta que la solución quede clara.

Solución trabajo.

Solución madre.	400 ml.
Buffer de fosfatos 0.2 M	400 ml.
Glutaraldehído al 25%	16 ml.

B.2.1. 4 ALCOHOL – ÁCIDO.

Alcohol de 96%	350 ml.
Ácido clorhídrico concentrado	5 ml.
Agua destilada	150 ml.

B.2.1. 5 AGUA AMONICAL AL 1%.

Hidróxido de amonio	5 ml
Agua destilada	495 ml

B.2.1.6 HEMATOXILINA DE HARRIS.

Hematoxilina	15 g.
Sulfato de aluminio y potasio	300 g.
Alcohol Etílico absoluto.	150 ml.
Agua destilada	3000 ml.
Óxido rojo de mercurio	7.5 g.

B.2.1.7 EOSINA.

Solución stock

Eosina amarillenta	1.0 g.
Alcohol Etílico al 96%.	80 ml.
Agua destilada	20 ml.

Solución de trabajo.

Solución stock	100 ml.
Etanol al 80%	300 ml.
Ácido acético glacial	2.0 ml.

B.2.1 .8 VIOLETA DE CRESILO.

Cristal violeta rápido	1 g
Agua destilada	1000 ml
Ácido acético al 10%	10 ml

NOTA: filtrarla y guardarla en el horno a 45°C. Se puede usar muchas veces.

B.2.1.9 SOLUCIÓN DE AZUL DE LUXOL RÁPIDO AL 0.1%.

Azul de luxol	0.1g
Etanol al 96%	100 ml

Disolver el colorante en el alcohol, adicionar 0.5 ml de ácido acético al 10% por cada 100 ml de solución.

B.2.1.10 SOLUCIÓN DE VIOLETA DE CRESILO AL 0.1%.

Violeta de cresilo	0.1 g
Agua destilada	100 ml

Después de preparada, se adiciona 10 gotas de ácido acético glacial posteriormente se filtra y ya queda lista para usarse (no requiere calentamiento).

B.2.1.11 SOLUCIÓN DE CARBONATO DE LITIO AL 0.05% (solución diferenciadora).

Carbonato de litio	0.05%
Agua destilada	100ml

B.2.1.12 SOLUCIÓN DE ALCOHOL AL 70%.

Alcohol etílico absoluto	70 ml
Agua destilada	30 ml

B.2.2 SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA.

La técnica de TUNEL se determinó utilizando el Kid TACS™ 2 TdT *In situ* Apoptosis Detection de Trevigen®, las soluciones marcadas con * se deben de preparar no más de treinta minutos antes de usarse.

*** B.2.2.1 Solución de proteinasa K (para cuatro muestras).**

Agua desionizada	200 µl
Proteinasa K	4 µl

*** B.2.2.2 Solución bloqueadora.**

Metanol	45 ml.
Peróxido de hidrógeno	5 ml

B.2.2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1X.

Buffer TdT 10X	**5 ml**
Agua destilada	**45 ml**

Usar 50 ml de Buffer TdT 1X para procesar de una a diez muestras, separe una alícuota de **50µl** por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje y almacenar en hielo.

B.2.2.4 Mezcla de reacción de marcaje.

Descongelar la mezcla de TdT dNTP a temperatura ambiente, y colocarla en hielo para mantener la actividad óptima de la enzima, sacar del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen y mantener la mezcla en hielo.
Preparar 50µl por muestra de la manera siguiente:

	2 MUESTRAS	**4 MUESTRAS**	**10 MUESTRAS**
Mezcla de TdT dNTP	**2** µl	**4** µl	**10** µl
Stock catiónica 50X	**2** µl	**4** µl	**10** µl
Enzima TdT	**2** µl	**4** µl	**10** µl
Buffer de marcaje TdT 1X	**100** µl	**200** µl	**500** µl

B.2.2.5 Buffer Stop TdT 1X.

Buffer stop TdT 1X	5 ml
Agua destiladada	45 ml

Usar 50 ml de Buffer stop TdT 1X para procesar de una a diez muestras. Almacenar a temperatura ambiente.

*** B.2.2.6 Solución Strep – HRP.**

	2 MUESTRAS	**4 MUESTRAS**	**10 MUESTRAS**
PBS 1X	**100** µL	**200** µL	**500** µL
Strep – HRP	**2** µL	**4** µL	**10** µL

Usar 50 µL solución Strep – HRP por muestra. Almacenar la solución a temperatura ambiente.

*** B.2.2.7 Solución de DAB.**

PBS 1X	50 ml
DAB	250 µL
Peróxido de hidrógeno al 30%.	50 µL

Descongelar DAB a 37°C. Almacene a temperatura ambiente, no en hielo. Preparar la solución no más de 30 minutos antes de usarla. Usar 50 ml de la solución de DAB para procesar de una a diez muestras.

B.2.2.8 Verde de metilo al 1%

Verde de metilo	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Este reactivo ya viene preparado en el Kid. Puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita filtre. También puede ser preparado.

B.2.2.9 Para correr el control positivo.

TACS – Nucleasa y Buffer.

Buffer de marcaje TdT 1X	**50** µl
Mezcla de TdT dNTP	1 µl
Stock Catiónica 50 X	**1** µl
Enzima TdT	**2** µl
TACS – Nucleasa	**1** µl

B.2.2.10 Para correr el control negativo.

Preparar la mezcla igual que para el control positivo omitiendo la enzima TdT, por agua milli-Q.

B.2.3 SOLUCIONES PARA MICROSCOPÍA DE ELECTRÒNICA.

B.2.3.1 Fijador de Karnovsky-Ito

Solución madre.

Paraformaldehído	16 g
Agua ultrapura	400 ml

Calentar cerca del punto de ebullición y agregar unas gotas de hidróxido de sodio, para quitar la turbidez.

Solución de trabajo.

Solución Madre	400 ml
Buffer de cacodilatos 0.1 M	400 ml
Glutaraldehído 25%	32 ml
Ácido pícrico	0.08 g

B.2.3.2 Fijador de tetraóxido de osmio al 2%.

tetraóxido de osmio	1.Og
Buffer de cacodilatos 0.1 M a pH 7.2 – 7.4	50 ml

B.2.3.3 Buffer de cacodilatos 0.1 M

Solución A

Cacodilato de sodio	4.28 g
Agua ultrapura	100 ml

Solución B

Ácido clorhídrico concentrado	0.5 ml
Agua ultrapura	25 ml

Solución de trabajo

Solución A	100 ml
Solución B	5.4 ml

Aforar a 200 ml con agua ultrapura y ajustar el pH a 7.2 -7.4.

B.2.3.4 Preparación de la mezcla de resinas epóxicas.

DDSA	4.3 ml
Resina	4.34 ml
NMA	1.4 ml
DMP-30	0.2 ml

APENDICE C

C.1 MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE TUNEL.

La técnica de TUNEL se llevó a cabo utilizando el kit TACS™ 2 TdT *In Situ* Apoptosis Detection de Trevigen® para muestras fijadas con formaldehído al 4 %, embebidas en parafina y cortes de 7 µm.

La fragmentación del DNA se detectó añadiendo dUTPs marcados en los extremos 3´OH libres del DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT) y posteriormente reconocidos por un anticuerpo antidigoxigenina unido a peroxidasa, la positividad se identificó con H_2O_2-diaminobencidina observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien verde claro (tinción de contraste: verde de metilo) en los núcleos negativos para esta técnica.

C.1.1 CONTROLES PARA LA TÉCNICA:

Control positivo: Los cortes fueron tratados con nucleasa para inducir la fragmentación del DNA.
Control negativo: Se empleó agua destilada en lugar de la enzima TDT.

C.1.2 PROCEDIMIENTO

Para tejido fijado con formaldehido al 4 % y embebido en parafina, y en cortes de 7 µm.

I.- DESPARAFINAR:

1.- Colocar los cortes en estufa a 57°C, cinco minutos.
2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol cinco minutos c/u.
3.- Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95 % y 70%, cinco minutos c/u.
4.- Sumergir en PBS 1 X, dos cambios cinco minutos c/u.

Nota: No permita que los cortes se sequen.

II.- PROTOCOLO DEL KIT

1.- Sumergir las muestras en PBS 1 X diez minutos a temperatura ambiente.

* *Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.*

2.- Cubrir con 50 µL/muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 minutos. a 37°C.

3.- Lavar dos veces en agua desionizada dos minutos c/u.

4.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por cinco minutos (*no más*) a temperatura ambiente.

5.- Lavar las muestras en PBS 1 X, un minuto.

6.- Sumergir en Buffer TDT 1 X, cinco minutos.

7.- Cubrir la muestra con 50 µL de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 minutos. a 37°C en cámara húmeda.

8.- Sumergir en Buffer Stop TDT 1 X, cinco minutos a temperatura ambiente.

9.- Lavar dos veces en PBS 1X dos minutos c/u a temperatura ambiente.

10.- Cubrir la muestra con 50 µL de solución Strep-HRP e incubar 10 minutos. 37 °C

11.- Lavar dos veces en PBS 1X dos minutos c/u.

12.- Sumergir en solución de DAB de dos a siete minutos.

13.- Lavar en varios cambios de agua desionizada dos minutos c/u.

III.- CONTRATINCIÓN:

1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por dos minutos.

2.- Sumergir las muestras de cinco segundos a cinco minutos en verde de metilo.

3.- Lavar las muestras subsecuentmente sumergiéndolas 10 veces en cada uno:

- Agua desionizada.
- Etanol 70 %, 2 cambios.
- Etanol 95 %, 2 cambios.
- Etanol 100 %, 2 cambios.
- Xilol 2 cambios.

4.- Limpie el exceso de xilol

5.- Montar y almacenar en oscuridad.

6. Observar al microscopio de luz.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad, S., Kitchin, K.T. and Cullen W.R. Arsenic species that cause release of iron ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 382: 195-202.

Anawar, H.M., Akai, J., Mostofa, K.M., Safiullah, S. and Tareq, S.M. Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environ. Int.* 2002; 27: 597-604.

Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 397-419.

Aposhian, H.V.,Maiorino, R.M., Dart, R.C., Perry, D.F. Urinary excretion of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in human subjects. Clin. Pharmacol. Ther. 1989 :45; 5: 520-526.

Aylward, R. L. and Totterdell, S. Neurons in the ventral subiculum amygdala and entorhinal cortez which project to the nucleus accumbens: Their input from somatostatin-inmunoreactive boutons. *J. Chem. Neuroanat.* 1993; 6: 31-42.

Bancroft, J.D., and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne and New York. Second Edition. 1982. pp 109 -114, 180 – 190 and 217-223.

Bencko, V. and Simon, K. Test of environmental exposure to arsenic and hearing changes in exposed children. *Environ. Health Perspect.* 1997; 19: 95-101.

Bottiglieri, T., Laundy, M., Crellin, R., Toone, B. K., Carney, M. W. P., and Reynolds, E.H. Homocysteine, folate, methylation and monoamine metabolism in depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2000; 69: 228-232.

Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y. and Zahm, D.S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* 1993; 338: 255-278.

Brostoff, S. and Eylar, E.H. Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971; 68: 765-769.

Brudzynski, S.M. and Gibson, C.J. Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res. Bul.I* 1997; 42: 303 - 308.

Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsonate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1981; 48: 71-79.

Calderón, J., Navarro M.E., Santos M.A., Jiménez-Capdeville M.E., Golden A., Borja V. and Díaz-Barriga F. Exposure to Arsenic and Lead and Neuropsychological Development in Mexican Children. *Environ. Res.* 2001; 85: 69-76.

Chattopadhyay, S., Bhaumik, S., Nag Chaudhury, A. and Das Grupa, S. Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicol. Lett.* 2002 a; 128: 73-84.

Chattopadhyay, S., Bhaumik, S., Purkayastha, M., Basu, S., Nag Chaudhuri, A., & Das Grupa, S. Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. *Toxicol. Lett.* 2002b; 136: 65-76.

Chen, H., Li, S., Liu, J., , B.A., Barret, J.C.and Waalkes, M.P. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implication for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 1779-1786.

Clarke, S. And Banfield, K. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases. (2001) In *Homocysteine in health and disease*. Carmel, R., Jacobsen, D.W. Eds, pp 63-78. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Clarkson, T.W. Metal toxicity in the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 1987; 75: 59-64.

Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E.C.,Miyoshi, E., Ferro, M. M., Anselmo-Franci, J. A. and Canteras, N.S. Evidence for the substantia nigra pars compact as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol. Learn Mem.* 2003; 79 (3):236-42 .

Dabrowska-Bouta, G., Sulkowski, L., Struzynska, U.and Rafalowska. CNPase activity in myelin from adult rat brains after prolonged lead exposure in vivo. *Chem Biol Interact.* 2004; 150: 171-178.

Dahlström, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Determination of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl: 232); 1964: 1-55.

De la Fuente, H., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Díaz-Barriga, F., Saavedra-Alanís, V., Layseca, E., & González-Amaro, R. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129: 69-77.

DeFrance, J.F., Marchand, J.E., Stanley, J.C. Sikes, R.W., Chronister, R.B. Convergence of excitatory amygdaloid and hippocamal input in the nucleus accumbens septi. *Brain Res.* 1980; 185: 183-186.

Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G.G., Garcia-Salcedo, J., Sanmiguel, M.F., Rivera, M., Hernández, M.C. and Cebrian, M.E. Arsenic levels in cogged food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, México. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1423-1431.

Delgado, J.M., Dufour, L., Grimaldo, J.L., Carrizales, L., Rodríguez, V.M., and Jiménez-Capdeville, M.E. Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adenocorticotropic hormone (ACTH) in mice. *Toxicol. Lett.* 2000; 117: 61-67.

Delnomdedieu, M., Basti, M.M, Otros, J.D, Thomas, D.J. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsenate by glutathione: multinuclear magnetic resonance study . *Chem. Biol. Interact.* 1994; 90: 139-155.

Deng, W. And Poretz, R.D. Lead exposure affects levels of galactolipid metabolic enzymes in the developing rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 172 (2): 98-107.

Edmonds, J.S., Francesconi, K.A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*. 1987; 43: 553-557.

El Massioui, N., Ouary, S., Hantraye, P., Brouillet E. Perseverative behavior underlying attentional set-shifting deficits in rats chronically treated whit the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 2001; 172 (1): 172-182.

Foa, V., Colombi, A., Maroni, M., Buratti, M. and Calzaferri, G. The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *Sci. Total Environ.* 1984; 34: 241-259.

Frisbie, S.H., Ortega, R., Maynard, D.M. and Sarkar, B. The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water. *Environ. Health Perspect.* 2002;110: 1147-1153.

García Chavez, E., Santamaria, A.,Díaz Barriga, F., Mandeville, P., Juárez, B.I. and Jiménez-Capdeville, M.E. Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. *Brain Res* 2003; 976: 82-89.

Garret, E., Alexander and Michael D. Crutcher. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *TINS*. 1990; 266-271.

Gerfen, C.R. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output system. *Nature* 1984; 311: 461-464.

Gerfen, C.R. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 1989; 246: 385-8.

Gerr, F., Letz., Ryan P.B. and Green R.C. Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans. *Neurotoxicology.* 2000; 21: 475-87.

Goebel, H.H., Schmidt, P.F., Bohl, J., Tettenbom, B., Kramer, G. and Gutmann, L.Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication: Biopsy studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1990; 49: 137-149.

Goyer, R.A. Toxic effects of metals. In: Doull, J., Klaassen, C.D. and Amdur, M.O., Eds. Toxicology. New York: *Pergamon Press*, 1991: 623-679.

Graveland, G.A. and DiFigilia, M. The frequency and distribution of medium- sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 1985; 327.

Graybiel, A.M. and Moratalla, R. Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 1989; 86: 9020- 9024.

Graybiel, A.M. Compartmental organization of the mammalian striatum. *Prog. Brain Res.* 1983; 58: 247-256.

Gridley, M.F., 1960. Manual of Histoloyg and Special Staining Techniques. McGrawHill, New York, 2nd Edition.

Heimer, L. and Wilson, R.D. 1975. The subcortical projections of the allocortez: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. *In* Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology. M. Santini, Ed: 177-193. *Raven Press. New York.*

Heimer, L., Zahm, D.S. and Alheid, G.F. Basal ganglia. In: Paxinos G, Ed. The rat nervous system. *San Diego, USA: Academic Press*,1995: 579-628.

Heymann, A., Pfeiffer, J.B., Willet, R.W. and Tylor, H.M., Peripheral neuropathy caused by arsenical intoxication: A study of 41 cases with observation on the effects of BAL (2,3 dimercapto–propanol), *New Engl. J. Med.* 1956; 254: 401-409.

Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 2002; 133: 1-16.

Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T. and Thomas, D.J., Strain – dependent disposition of inorganic arsenic in the mouse. *Toxicology.* 1999; 137: 95-108.

Hughes, M.F., Menache, M. and Thompson, D.J., Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1994; 22: 80-89.

Ito, S. and Karnovsky, M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds. *J. Cell. Biol.* 1968; 39: 168 – 170.(

Itoh,T., Zhang, Y.F., Murai, S., Saito, H., Nagahama, H., Miyate, H., Saito, Y., and Abe, E. The effects of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol. Lett.* 1990; 54: 345-353.

Kannan, G.M., Tripathi, N., Dube, S.N.,Gupta, M., and Flora, S.J., Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001; 39: 675-682.

Klaassen, C.D. Heavy metals and Heavy-metals antagonist. In: Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. and Taylor, P, Eds. *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw-Hill, 1996: 1592-1614.

Klüver, H. And Barrera, E. A. A method for the combined staining of cell and fibers in the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*1953; 12: 400-403.

Lee, C.C., Surtees, R. and Duchen, L.W., Distal motor axonopathy and central nervous system myelin vacuolation caused by cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain.* 1992; 115: 935-955.

Li, W. And Chou, I.N. Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1992; 114 (1): 132-139.

Lin, S., Shi, Q., Nix, B., Styblo, M., Beck, M., Herbin-Davis, K.M, Hall, L.L., Simeonsson, J.B. and Thomas, D.J. A Novel S-adenosyl-L-methionine: arsenic (III) methyltransferase from rat liver. Cytosol. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:10795-10803.

Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. and Rosen, B. Arsenite transport by mammalian aguaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Ntl. Acad. Sci USA.* 2002; 99: 6053-6058.

Marafante, E., and Vahter, M. The effect of dietary and chemically induced methylation deficiency on the metabolism of arsenate in the rabbit. *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh.). 1986; 59 (Suppl 7), 35-38.

Marin, O., Smeets, W.J and Gonzalez, A. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends. Neurosci.* 1998; 21: 487-494.

Mass, M.J., Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J. and Kligerman, A.D. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 355-361.

Meck, W.H., and Williams, C.L. Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation: Implications for memory and attentional processing across the lifespan. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003; 27: 385-399.

Meeker, D., Kim, J.H.and Vezina, P. Depletion of dopamine in the nucleus accumbens prevents the generation of locomotion by metabotropic glutamate receptor activation. *Brain Res.* 1998; 812: 260 – 264.

Mejia, J.J., Díaz-Barriga, F., Calderon, J., Rios, C., and Jiménez-Capdeville, M.E. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic system. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997; 19: 489-497.

Moore, M.M., Harrington-Brock, K. and Doerr, C.L. Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Res.* 1997; 386: 279-290.

Nagaraja, T.N., and Desiraju, T. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994; 13: 353-356.

Nagaraja, T.N., and Desiraju, T. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1993; 50: 100-107.

Namgung, U and Xia, Z. Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun-N-Terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 2000; 20: 6442-6451.

Naqvi, S.M., Vaishnavi, C. and Singh, H. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates. In: Nriagu, J.O. (Ed.), Arsenic in the Environment Part 2. Wiley, New York. 1994: 143-157.

Nauta, W.J., Smith, G.P., Faull, R.L. and Domesick, V.B. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 1978; 3: 385 – 401.

Niculescu, M.D., and Zeisel, S.H. Diet, methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.* 2002; 132: 2333S – 2335S.

Oades, R.D. and Halliday, G.M. Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. I. Anatomy and connectivity. *Brain Res. Rev.* 12; 1987: 117-165.

Odanaka, Y., Mtano, O. and Goto, S. Biomethylation of organic arsenic by the rat and some laboratory animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1980; 24: 452-459.

Parent, A. and Hazrati, L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia- thalamo- cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 91-127.

Paxinos, G., and Watson, C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York.

Petrick, J.S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Vasken, and Aposhian, H., 2000. Monomethylarsonous acid (MMN (III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000; 163: 203-207.

Pothuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen- Relo, A.L., Feldon, J. and Yee, B.K. Dissociation of function between the dorsal and ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subjects, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19 (3): 705-712.

Pryor, G.T., Uyeno, E.T., Tilson, H.A., and Mitchell, C.L., Assessment of chemical using a battery of neurobehavioral tests: A comparative study. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983; 5: 91-117.

Rahman, L., Corns, W.T., Bryce, P. and Stockwell, P. Determination of mercury, Selenium, Bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic Fluorescence Spectrometry. *Talanta.* 2000; 52: 833-843.

Richardson, K.C., Jarret, E.H. and Finke, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35; 1960: 313-325.

Rodríguez, V.M., Carrizales, L.,Jiménez-Capdeville, M.E., Dufour, L., and Giordano, M. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res. Bull.* 2001; 55: 301-308.

Rodríguez, V.M., Del Razo, L.M., Limon-Pacheco, J.H., Giordano, M., Sánchez-Peña, L.C., Uribe-Querol, E., Gutiérrez-Ospina, G. and Gonsebatt, M.E. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* 2004; 00: 1-10.

Rodríguez, V.M.,Carrizales, L. Mendoza, M.S., Fajardo, O.R., and Giordano, M. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 743-750.

Schäfer, S.G., Dawes, R.L.F., Elsenhan, B., Forth, W. and Schümann, K. Metals. In: Marquardt, H., Schäfer, S.G., McClellan, R.O. (Eds.), Toxicology. Academic Press, San Diego, CA. 1999: 755-790.

Schmidt, W.J. and Kretschmer, B.D. Behavioral pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21: 381 – 392.

Schmitz, G.G., Walter, T. Seibl, R. and Kessler, C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 1991; 192: 222 – 23

Schoolmeester, W.L. and White, D.R. Arsenic poisoning. *South Med. J.* 1980; 73: 198-208.

Scott, N., Hatlelid, K.M., MacKenzie, N.E. and Carter, D.E. Reaction of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6:102-106.

Sesack S.R. and Pickel V.M., In the rat medial nucleus accumbens, hippocamal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res.* 1990; 527: 266-279.

Simeonova, P.P., Wang, S., Toriuma, W., Kommineni, V., Matheson, J., Unimye, N., Kayama, F., Harki, D., Ding, M., Vallyathan, V. and Luster, M.I. Arsenic mediates